

## 乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒

微板法 96T

### 一、试剂盒组成及配制：

	组 份	48T	96T	保 存
试剂一	基质缓冲液	3ml×1 瓶	5ml×1 瓶	2~8℃保存
试剂二	辅酶 I	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20℃冷冻保存
	辅酶 I 溶液配制：每支粉剂加 1.3ml 双蒸水溶解，溶解后冷冻可保存 2 周，如需多次使用建议分装冷冻（防止反复冻融）			
试剂三	2, 4-二硝基苯肼	3ml×1 瓶	5ml×1 瓶	2~8℃避光保存
试剂四	4mol/L NaOH	3ml×1 瓶	5ml×1 瓶	2~8℃保存
	0.4mol/LNaOH 溶液配制：将 4mol/LNaOH 溶液用双蒸水 10 倍稀释，需多少配多少			
试剂五	2 μ mol/ml 丙酮酸标准液	1ml×1 支	1ml×1 支	2~8℃保存
<b>0.2 μ mol/ml 丙酮酸标准应用液配制：</b> 取 2 μ mol/ml 丙酮酸标准液用双蒸水 10 倍稀释，现用现配				

### 二、样本采集及保存：

- 1、本试剂盒适用于检测动物血清、组织、灌流液、细胞培养液等中乳酸脱氢酶(LDH)的活力。
- 2、按常规采集样本，样本可以是血清、血浆（肝素抗凝为佳）、细胞培养上清。组织或细胞（按实验方法学的样本前处理）。
- 3、如不能及时检测，请将样本放置于-20℃以下保存。
- 4、测定前的样本前处理需参照实验方法学。

### 三、测定步骤：

	空白孔	标准孔	测定孔	对照孔
双蒸水(μl)	25	5		5
0.2 μ mol/ml 丙酮酸标准液(μl)		20		
待测样本(μl)			20	20
基质缓冲液(μl)	25	25	25	25
辅酶 I (μl)			5	

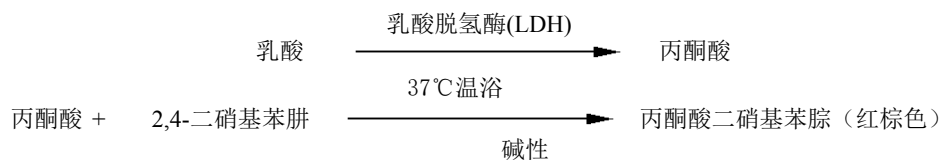
混匀，37℃温浴 15 分钟				
2, 4-二硝基苯肼(μl)	25	25	25	25
混匀，37℃温浴 15 分钟				
0.4mol/L NaOH 溶液(μl)	250	250	250	250
混匀，室温放置 5 分钟，波长 450nm，酶标仪测定吸光度值。				

**\*参考取样量** 0.01%小鼠脑组织匀浆取 5~20μl（根据样本活力高低确定取样量），人血清 10 倍稀释取 10~30μl（根据样本活力高低确定取样量）。若样本中 LDH 酶活力太高，可将样本用生理盐水稀释后再测。具体摸索方法见附录。

注：1、对照孔中不加辅酶 I。

2、严格按照说明书操作，不可先加辅酶 I 再加基质液。

#### 四、测定原理



根据比尔定律，可测乳酸脱氢酶（LDH）活性。

#### 五、注意点：

1、由于加样量比较少，

**建议：**① 加样时左手稳住加样枪；

② 将吸头靠近酶标孔底部，缓慢加样，边加边将吸头上移，以保证吸头上样本残留量最少；

③ 如有秤盘式离心机，可缓慢离心数分钟，以保证样本及试剂聚集至酶标孔底部，以减少误差。

2、加试剂时需要注意，速度不宜太快，以免溅出酶标孔。

3、酶标孔比较小，所以混匀力度要适中，使用摇床或手动混匀时，动作不宜太过剧烈，以免液体溅出，太慢则混匀不充分；先将孔壁上的液体轻轻的震动落下，再前后、左右的摇动。

4、酶标板可能存在初始吸光度的差异，最好在使用前先在相应的波长处测定其初始吸光度，记录下差异，然后再加样测定。

5、辅酶 I 加样量比较少，所以最好加入时将吸头在反应液中反复吸打几次，并注意更换吸头。

6、加样时要尽量避免产生气泡。倘若有气泡，须将气泡破碎后再进行测定。

7、本试剂盒仅用于科研、实验室。

#### 1、前处理：

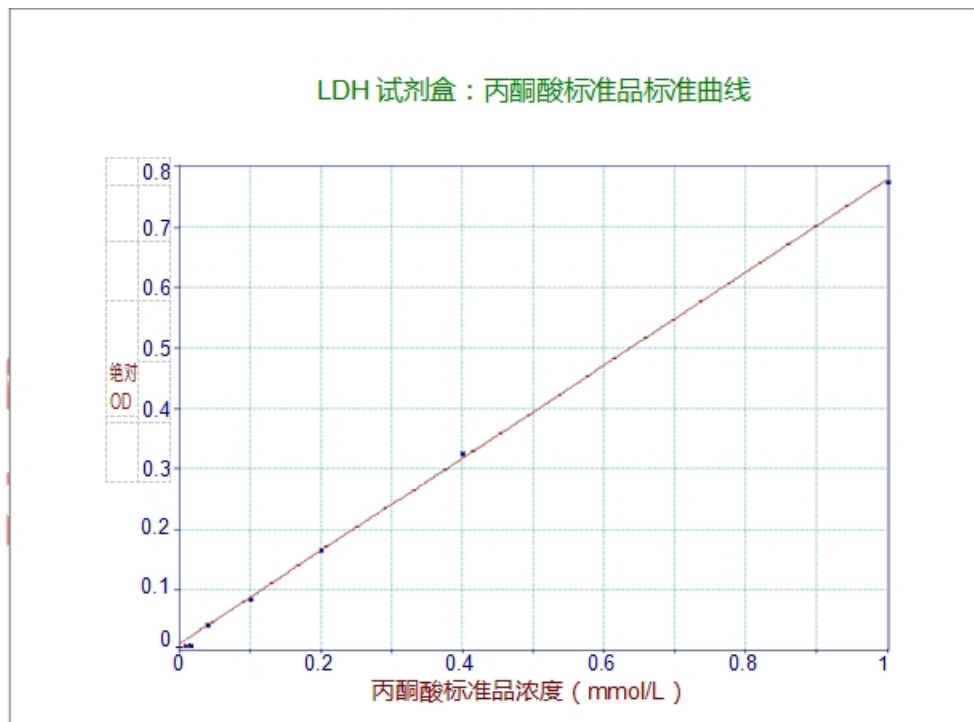
将 2μmol/ml 的丙酮酸标准品用双蒸水分别 200 倍、100 倍、50 倍、20 倍、10 倍、5 倍、2 倍稀释后按照操作表制作标准曲线。

#### 2、操作表：

	空白孔	标准孔
--	-----	-----

双蒸水( $\mu\text{l}$ )	25	5
不同浓度丙酮酸标准液( $\mu\text{l}$ )		20
基质缓冲液( $\mu\text{l}$ )	25	25
混匀, 37°C 温浴 15 分钟		
2-4-二硝基苯肼( $\mu\text{l}$ )	25	25
混匀, 37°C 温浴 15 分钟		
0.4mol/l 氢氧化钠溶液( $\mu\text{l}$ )	250	250
混匀, 室温静置 5 分钟, 波长 450nm, 酶标仪测定吸光度值。		

3、绘图如下:



附录 II : 大鼠血浆 LDH 取样浓度摸索

- 1、试剂及配制: 由南京建成生物工程研究所提供并按说明书配制。
- 2、样本来源: 以本所大鼠血浆为例, 进行 LDH 检测最佳取样浓度摸索。
- 3、操作表: (将原大鼠血浆浓度视为 1, 则 100 倍稀释后浓度视为 0.01, 以此类推其他相应浓度)

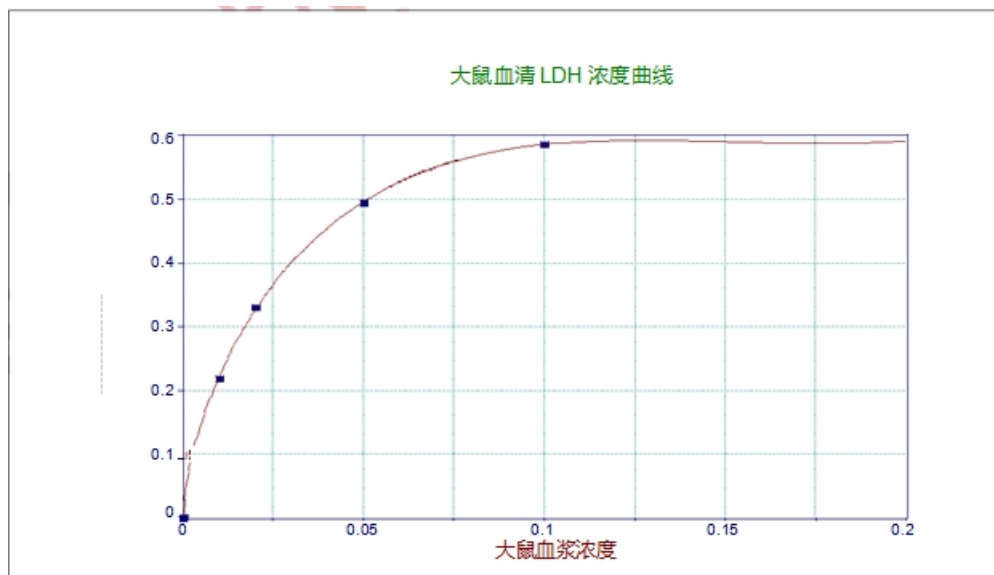
	空白孔	标准孔	测定孔	对照孔
双蒸水( $\mu\text{l}$ )	25	5		5
0.2 $\mu\text{mol/ml}$ 丙酮酸标准液( $\mu\text{l}$ )		20		
待测样本( $\mu\text{l}$ )			20	20

基质缓冲液( $\mu$ l)	25	25	25	25
辅酶 I ( $\mu$ l)			5	
混匀, 37 $^{\circ}$ C 温浴 15 分钟				
2, 4-二硝基苯肼( $\mu$ l)	25	25	25	25
混匀, 37 $^{\circ}$ C 温浴 15 分钟				
0.4mol/L NaOH 溶液( $\mu$ l)	250	250	250	250
混匀, 室温放置 5 分钟, 波长 450nm, 酶标仪测定吸光度。				

#### 4、测定结果:

稀释倍数	空白	100 倍	50 倍	20 倍	10 倍	5 倍
测定 OD	0.0589	0.2799	0.3973	0.5795	0.6929	0.7427
对照 OD	0.0589	0.0613	0.0667	0.0851	0.1064	0.1509
绝对 OD 值	0.0000	0.2186	0.3306	0.4944	0.5866	0.5918

参考取样浓度: 大鼠血浆为 50~100 倍稀释, 最佳取样量为 20  $\mu$ l。在其范围内酶曲线通过回归曲线的处理, 相对成正比关系。(若稀释浓度过大或过少, 则在实验结束后, 在进行统计学处理时会出现无显著差异)



#### 附录III: 大鼠肾匀浆 LDH 取样浓度摸索

- 1、试剂及配制: 由南京建成生物工程研究所提供并按说明书配制。
- 2、样本来源: 正常组大鼠肾组织

#### 3、前处理:

大鼠肾组织取出后用生理盐水制成 10%的匀浆上清液 (具体见实验方法学), 用生理盐水 10 倍稀释成 1%

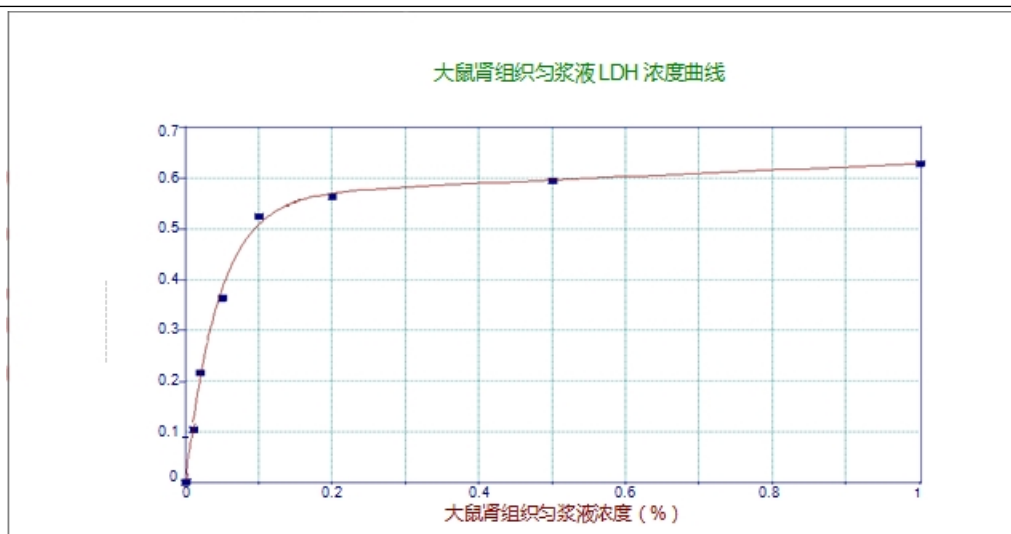
后再用生理盐水分别稀释成不同的浓度：0.01%、0.02%、0.05%、0.1%、0.2%、0.5%。同时用 0.5%的肾组织匀浆液用于蛋白定量（考马斯亮蓝法测定蛋白，本所有售）。

**4、操作表：**

	空白孔	标准孔	测定孔	对照孔
双蒸水(μl)	25	5		5
0.2 μ mol/ml 丙酮酸标准液(μl)		20		
待测样本(μl)			20	20
基质缓冲液(μl)	25	25	25	25
辅酶 I (μl)			5	
混匀，37℃温浴 15 分钟				
2, 4-二硝基苯肼(μl)	25	25	25	25
混匀，37℃温浴 15 分钟				
0.4mol/L NaOH 溶液(μl)	250	250	250	250
混匀，室温放置 5 分钟，波长 450nm，酶标仪测定吸光度。				

**5、结果：**

样本浓度	空白	0.01%	0.02%	0.05%	0.1%	0.2%	0.5%	1%
测定 OD	0.0588	0.1653	0.2807	0.4473	0.6187	0.6979	0.8065	0.9133
对照 OD	0.0588	0.0594	0.0636	0.0833	0.0930	0.1340	0.2120	0.2835
绝对 OD	0.0000	0.1059	0.2171	0.3641	0.5257	0.5639	0.5945	0.6298



由以上曲线可见绝对吸光度 OD 值介于 0.05~0.50 之间呈线性相关，最佳绝对吸光度在控制在 0.2~0.4 之间，根据您实验中的具体情况来选择最佳取样浓度